

Aus der Medizinischen Universitätsklinik in Marburg
Direktor: Professor Dr. med. G. A. Martini

UNTERSUCHUNGEN ÜBER DAS VERHALTEN DES
SERUM-INSULINS BEI PATIENTEN MIT CHRONISCH
CALZIFIZIERENDER PANKREATITIS UND DIABETES MELLITUS

Teil I:

Untersuchungen zu einer Methode der
Bestimmung von Insulin im Serum

Teil II:

Insulinbestimmungen bei Patienten mit chronisch
calzifizierender Pankreatitis unter
Belastung mit Glukagon und Pankreozymin

INAUGURAL-DISSERTATION
zur Erlangung des Doktorgrades
der gesamten Medizin

dem Fachbereich Humanmedizin der
Philipps-Universität zu Marburg

vorgelegt von

ULF BERSCH
aus Marburg

Marburg 1975

Druck: Görich & Weiershäuser, Marburg (Lahn)

UNTERSUCHUNGEN ÜBER DAS VERHALTEN DES
SERUM-INSULINS BEI PATIENTEN MIT CHRONISCH
CALZIFIZIERENDER PANKREATITIS UND DIABETES MELLITUS

Teil I:

Untersuchungen zu einer Methode der
Bestimmung von Insulin im Serum

Teil II:

Insulinbestimmungen bei Patienten mit chronisch
calzifizierender Pankreatitis unter
Belastung mit Glukagon und Pankreozymin

INAUGURAL-DISSERTATION
zur Erlangung des Doktorgrades
der gesamten Medizin

dem Fachbereich Humanmedizin der
Philipps-Universität zu Marburg

vorgelegt von

ULF BERSCH

aus Marburg

Marburg 1975



Angenommen vom Fachbereich Humanmedizin
der Universität Marburg am 6. 5. 1975

gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs

Dekan:	Prof. Dr. med. H. Oepen
Referent:	Prof. Dr. med. A. Englhardt
Correferent:	Prof. Dr. med. H. Gottesbüren

Untersuchungen zu einer Methode der Bestimmung von
Insulin im Serum

I n h a l t

	Seite
I. <u>Einleitung</u>	1
Methoden der Insulinbestimmung	2
II. <u>Material und Methode</u>	3
Reagenzien	3
Testprinzip	5
Durchführung des Immunoassays	6
III. <u>Ergebnisse</u>	8
Präzision	8
Reproduzierbarkeit	10
Richtigkeit	11
Wiederfindung	13
Bindungskapazität	16
Inkubationsdauer	16
IV. <u>Diskussion</u>	20
Standardkurven	21
Fehlerquellen	28
V. <u>Zusammenfassung</u>	29
VI. <u>Literatur</u>	31



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41552328_0066

Untersuchungen zu einer Methode der Bestimmung von Insulin im Serum

Einleitung

Für die Bestimmung von Proteohormonen und Polypeptidhormonen im menschlichen Serum gibt es eine große Zahl von Modifikationen radio-immunologischer Methoden. Diese Methoden beruhen auf der Bindung eines Antikörpers an ein mit radioaktivem Isotop beladenes Antigen sowie der kompetitiven Hemmung dieser Reaktion durch ein unbeladenes Antigen. Das an den Antikörper gebundene, markierte Antigen muß vom ungebundenen abgetrennt und die Radioaktivität in einer oder in beiden Fraktionen gemessen werden. Für den speziellen Fall der Serum-Insulinbestimmung wurden zahlreiche Methoden ausgearbeitet, die folgendes gemeinsames Prinzip haben: Durch das endogene Insulin einer Serumprobe wird die Bindung von ^{125}J -- oder ^{131}J -markiertem Insulin an Insulinantikörper kompetitiv gehemmt.

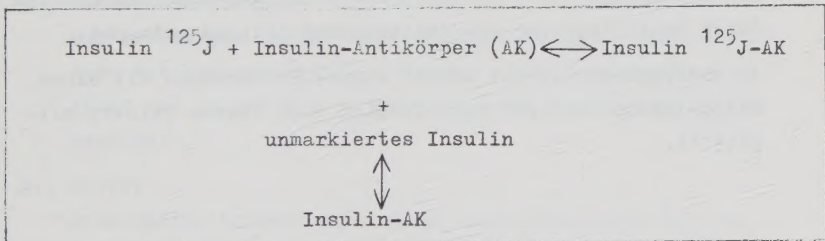


Abb. 1: Reaktion von Insulin ^{125}J mit dem Antikörper.

Kompetitive Hemmung der Reaktion durch unmarkiertes Insulin.

Der Insulingehalt der Serumprobe wird durch Vergleich mit einem Insulinstandard erhalten, der in gleicher Weise das markierte Insulin aus seiner Bindung zu verdrängen vermag. Durch Zusatz von nicht markiertem Insulin zu dem System aus Insulin-Antikörper und markiertem Insulin wird der freie Anteil (F) des letzteren in exponentieller Abhängigkeit von der zugesetzten Insulinmenge vergrößert. Gleichzeitig nimmt dadurch der gebundene Anteil (B) ab, so daß der Quotient B/F mit ansteigenden Insulinmengen exponentiellen Gesetzmäßigkeiten folgend kleiner wird.

Die Methoden unterscheiden sich im wesentlichen durch unterschiedliche Trennungsvorgänge von Antikörpergebundenem und freiem Insulin.

Folgende Verfahren wurden beschrieben: Papierelektrophorese und - chromatographie (17, 18), Agarelektrophorese (8), Salz- (2) oder Alkoholfällung (4, 10), Präzipitation der Insulin-Antikörperkomplexe durch einen zweiten Antikörper gegen den Insulin-Antikörper (9, 3, 13), Adsorption des freien Insulins an Cellulose (16, 19), Ionenaustauscher (7) oder Aktivkohle (5), Gelfiltration an Sephadex (1) und die enzymatische Proteolyse des freien Hormons durch Pronase (15), sowie die Trennung durch Talkum (12).

Das nachstehende Verfahren beruht auf einem von WIDE und PORATH (14) angegebenen Prinzip: Antikörper gegen ein zu bestimmendes Hormon bzw. Protein werden chemisch an ein unlösliches Polymer (Sephadex) gebunden, wobei sie die Fähigkeit zur spezifischen Antigenbindung behalten. Nach der Inkubation mit dem Antigen wird der Antigen-Antikörper-Sephadex-Komplex durch Zentrifugieren vom ungebundenen Antigen getrennt.

In vorliegender Arbeit werden eigene Erfahrungen mit einem Radio-Immunoassay für Seruminsulin nach diesem Prinzip mitgeteilt.

Material und Methode

Folgende Reagenzien wurden verwandt:

1.) Standard-Insulin

Es handelt sich um Insulin vom Schwein, das mit Phosphatpuffer und Albumin (0,3 %) stabilisiert und mit diesen Substanzen zusammen lyophilisiert wurde. Das Insulin ist eingestellt gegen den immunologischen Insulinstandard der WHO (s.u.).

2.) ^{125}J -markiertes Insulin

Als Radioinsulin wird Insulin vom Schwein benutzt, das nach einer Modifikation der Chloramin-T-Methode nach HUNTER und GREENWOOD (6) mit ^{125}J markiert wurde. Das Insulin ^{125}J hat zum Zeitpunkt der Herstellung eine spezifische Aktivität von 380 mCi/mg. Dies entspricht der Markierung jedes einzelnen Insulinmoleküls, also einer 100 %igen Beladung.

3.) Insulin-Antikörper

Die Antikörper wurden durch Immunisierung von Meerschweinchen mit Schweine-Insulin erzeugt, mit Natriumsulfat gefällt und an aktivierte Sephadexpartikel als feste Phase gekoppelt.

4.) Puffer

Beim Puffer handelt es sich um einen Phosphatpuffer von pH 7,4 mit Zusatz von 0,3 % Humanalbumin.

Standard-Insulin, Insulin ^{125}J , Sephadex-Anti-Insulin-komplex (SAIK) und Puffer wurden uns in lyophilisiertem Zustand von der Firma "Deutsche Pharmacia GmbH" Frankfurt am Main zur Verfügung gestellt. Die Rekonstitution erfolgte nach Vorschrift der Herstellerfirma.

5.) Insulin-Standard

Es wurde der Humaninsulin-Standard Nr. 66/304 für immunologische Testverfahren verwendet.

Das Insulin wurde uns vom National Institute for Medical Research, London, Division of Biological Standards and International Laboratory for Biological Standards überlassen.

Die Ampulle enthielt etwa 130 µg Humaninsulin, entsprechend 3 Einheiten (bestimmt mit biologischen Tests gegen den 4. internationalen Standard für Insulin, Schwein/Rind).

Testprinzip

Ein Aliquot des zu untersuchenden Serums bzw. der Insulin-Eichlösung wird mit einem definierten Volumen einer ^{125}J -markierten Insulinlösung gemischt. Danach wird ein Anteil der Suspension von SAIK zugesetzt. Während der darauffolgenden Inkubation erfolgt die Bindung sowohl von markiertem wie von nichtmarkiertem Insulin an die polymergeköpkelten Antikörper. In dem entstehenden Gleichgewicht zwischen markiertem Insulin-SAIK hängt die Radioaktivität der Sephadexpartikel vom Verhältnis zwischen Serum-Insulin und Insulin ^{125}J ab.

Bezeichnet man die Radioaktivität des zugesetzten Insulins ^{125}J mit C_0 , die Menge des nicht markierten Insulins mit i und die Radioaktivität des Insulin-SAIK bei $i=0$ mit C_{i0} , so entsteht während der Inkubation unter den Bedingungen $i=0$ ein Verhältnis C_{i0}/C_0 von etwa 1:7 - 1:3.

Bei steigenden Konzentrationen von i steht C_i/C_{i0} in einer gesetzmäßigen, nicht linearen Beziehung zu i . Sie kann mit Hilfe von Eichlösungen in einer Standardkurve festgelegt werden.

Die beladenen polymeren Partikel werden durch Zentrifugieren sedimentiert, der Überstand wird abgesaugt. Nach mehrmaligem Waschen wird die Radioaktivität des Sediments in einem Szintillationszähler gemessen. Die Relation C_{i0}/C_0 ergibt sich aus einem Kontrollansatz aus Insulin ^{125}J ohne Zusätze und einem zweiten, der Insulin ^{125}J und SAIK enthält. Den Insulin-gehalt der zu untersuchenden Probe erhält man durch Vergleich der gemessenen Radioaktivität mit einer Standardkurve, bei der die Konzentrationen der Eichlösungen gegen den Quotienten C_i/C_{i0} aufgetragen werden.

Durchführung des Immunoassays

Der SAIK wird mit 100 ml Phosphatpuffer pH 7,4 versetzt und zur Herstellung einer gleichmäßigen Suspension etwa 5 min. mit einem Magnetrührer gerührt.

8 ng Insulin ^{125}J , entsprechend 3 μCI werden in 10 ml Phosphatpuffer gelöst.

Aus einer Stammlösung von 320 $\mu\text{U/ml}$ Schweineinsulin wird eine Verdünnungsreihe von 320, 160, 80, 40, 20, 10 und 5 $\mu\text{U/ml}$ mit Phosphatpuffer hergestellt.

In die Teströhrchen pipettiert man je 100 μl der unbekannten Proben bzw. der Eichlösungen. Dazu gibt man je 100 μl Insulin ^{125}J -Lösung und je 1 ml der SAIK-Suspension. Von den Proben werden Doppelbestimmungen, von den Standardlösungen Dreifachbestimmungen vorgenommen. Ein Leerwert, der 100 μl Insulin ^{125}J , 1 ml SAIK-Suspension und 100 μl Pufferlösung enthält, wird in dreifachem Ansatz hergestellt.

Die Teströhrchen zur Ermittlung der gesamten zugesetzten Radioaktivität enthalten lediglich 100 μl Insulin ^{125}J . Sie werden nicht mit inkubiert.

Der Nulleffekt des Zählers wird durch drei leere Teströhrchen ermittelt.

Der SAIK wird zu allen Teströhrchen als letztes Reagenz zugesetzt, um eine Präinkubation von Insulin oder Insulin ^{125}J mit dem Antikörper zu vermeiden.

Danach werden die Teströhrchen bei Raumtemperatur über 24 Std. inkubiert. Durch langsame vertikale Rotation bleiben die SAIK-Teilchen in Suspension, und eine mechanische Läsion der SAIK wird weitgehend verhindert. Nach Beendigung der Inkubation wird 1 min. bei 4000 x g zentrifugiert, um die Sephadex-Antikörperteilchen zu sedimentieren. Der Überstand wird mit einer Absaugkanüle bis 5 mm über den Röhrchenboden abgesaugt. Durch mehrmaliges Waschen mit 2 ml 0,9 %iger NaCl-Lösung, Zentrifugieren und Absaugen werden nicht an SAIK gebundene Insulin- und Insulin ^{125}J -Moleküle aus den Röhrchen entfernt.

Nach dem letzten Absaugen des Überstandes wird die Radioaktivität der Teströhrchen im Szintillationszähler gemessen.

Dabei wird die Meßzeit für 3000 Counts je Röhrchen ermittelt.

Nach Abzug des Nulleffekts und Umrechnung der Zählzeiten in Counts/min. werden die Werte der Eichlösungen und der Serumproben in % auf die mittlere Zählrate des Leerwertes bezogen. Die ermittelten Prozentwerte der Eichlösungen werden zur Aufstellung der Standardkurve in einem halblogarithmischen Koordinatensystem linear gegen den Logarithmus der Insulinkonzentration aufgetragen.

Kontrolle der Funktionsfähigkeit des Testansatzes:

Zur Kontrolle der Bindungsfähigkeit des SAIK wird die Zählrate der Leerwertprobe in Relation zur gesamten zugesetzten Aktivität gesetzt:

$$\text{Bindungsfähigkeit} = \frac{C_{io} \times 100}{C_o}$$

Das Ergebnis soll im Bereich von 15 bis 30 % liegen.

Ergebnisse

Präzision

Die Präzision der Mehrfachbestimmungen wurde durch die Variationskoeffizienten $V\%$ ausgedrückt. Sie sind für die Eichlösungen in der Tabelle 1 angegeben. Der Mittelwert der Variationskoeffizienten betrug $2,4\%$.

Für die einzelnen Eichlösungen wurden aus 3-fach Bestimmungen die Mittelwerte errechnet. Die Mittelwerte benachbarter Eichlösungskonzentrationen unterscheiden sich signifikant (Tabelle 1).

Eichlösung pU/ml	n	$\frac{C_i \cdot 100}{C_{10}}$	%	S	V %	t	p
320	3	20,9		0,1	0,5	23,4	< 0,001
160	3	29,1		0,6	2,0	11,3	< 0,001
80	3	41,0		1,7	4,2	11,3	< 0,001
40	3	55,7		1,5	2,7	15,6	< 0,001
20	3	69,5		0,3	0,4	15,8	< 0,001
10	3	79,9		1,1	1,4	2,8	< 0,05
5	3	87,7		4,8	5,5	2,8	< 0,05
0	3	100,0		6,5	6,5		

Tabelle 1: Mittelwerte, Standardabweichungen und Variationskoeffizienten für die SAIK-gebundene Radioaktivität der Eichlösungen einer Standardkurve.
Signifikans der Unterschiede für die Mittelwerte zweier benachbarter Eichlösungskonzentrationen.

Zur Kontrolle des Szintillationszählers wurden Mehrfachmessungen derselben Proben durchgeführt. Dabei wurde eine Standardabweichung der Zählzeiten von $1,3\%$ gefunden.

Da sich bei konstanter Zählrate die Zeit proportional zur zugesetzten Insulindosis verhält, erhält man die kürzesten Zählzeiten im sog. "Leerwert", d. h. ohne Zusatz von unmarkiertem Insulin. Bei der gewählten Einstellung des Zählers wurden für diesen Leerwert gut reproduzierbare Zählzeiten von etwa einer Minute erhalten. Sie verlängerten sich bei der höchsten Eichlösungskonzentration auf etwa das Fünffache. Der Nulleffekt lag bei allen Testansätzen unter 4 % der Zählrate für die Eichlösung 320 μ U/ml.

Reproduzierbarkeit

Seren aus einer i. v.-Glukosebelastung mit unterschiedlichem Insulingehalt wurden viermal gemessen. Jede Messung wurde mit einem neuen Testansatz und einer eigenen Standardkurve in dreifachem Ansatz durchgeführt.

Die Ergebnisse der Messungen und die Abweichungen finden sich in Tabelle 2. Der mittlere Variationskoeffizient für die Messungen der einzelnen Seren betrug 9,8 %.

Min. nach i.V. Glukose	µU Insulin/ml Serum, fest- gestellt in Messung				X	S	V%
	1	2	3	4			
0	7,6	6,9	5,6	6,4	6,6	0,8	12,7
2	225	220	200	200	211,3	13,1	6,2
5	130	145	125	125	131,3	9,5	7,2
10	83	60	76	78	74,3	9,9	13,4
15	66	66	62	65	64,8	1,9	2,9
30	55	38	50	42	46,2	7,7	16,6

Tabelle 2: Vierfach-Messung von sechs Seren einer i.v.-Glukosebelastung, Mittelwerte, Standardabweichungen und Variationskoeffizienten.

Richtigkeit

Zur Prüfung der Richtigkeit der Eichlösungskonzentrationen des im Test verwendeten Schweineinsulins wurde die Standardkurve mit der Kurve einer Verdünnungsreihe von Insulin bekannter Konzentration verglichen. Dazu wurde Humaninsulin für Immunoassays Nr. 66/504 der WHO benutzt. Es wurde eine Serien-Verdünnungsreihe des Humaninsulins mit folgenden Konzentrationen hergestellt: 300; 150; 75; 37,5; 18,8; 9,4; 4,7; $\mu\text{U/ml}$. Es wurden Dreifachbestimmungen durchgeführt. Die Ergebnisse zeigen eine gute Übereinstimmung mit der Standardkurve.

Die beiden Kurven sind in Abbildung 2 wiedergegeben.

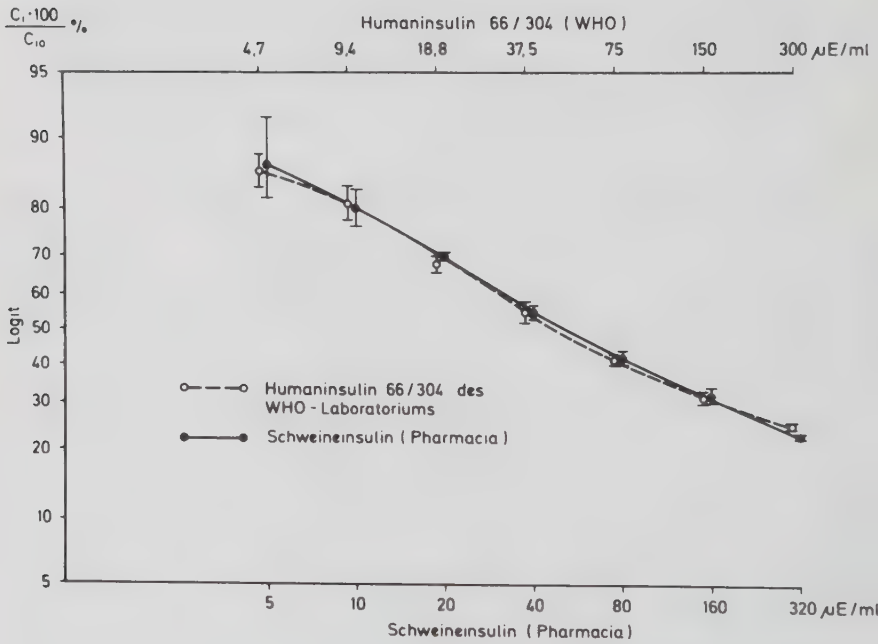


Abbildung 2 Vergleich der Verdünnungsreihen von Humaninsulin 66/304 des WHO-Laboratoriums und Schweineinsulin (Pharmacia). Auftragung in Logit-Log-Transformation.

Wiederfindung

Eichlösungen und Seren mit verschiedenem, bekanntem Insulingehalt wurden gemischt. Der errechnete Insulingehalt der Mischung wurde mit dem gemessenen verglichen (Tabelle 3).

Bei der Verdünnung von Eichlösungen (Tabelle 5) und Seren (Tabelle 4) mit Phosphatpuffer stimmten die gemessenen Insulinkonzentrationen mit den berechneten gut überein. Die Ergebnisse aller Messungen sind in Abbildung 3 zusammengefaßt.

Eichlösung $\mu\text{U/ml}$	+	Serum $\mu\text{U/ml}$	Gehalt der Mischung 1:1	
			berechnet	$\mu\text{U/ml}$ gemessen
320		200	260	280
160		76	118	130
80		126	103	103
40		200	120	123
20		62	41	48
10		50	30	34
5		200	103	110

Tabelle 3: Wiederfindung der errechneten Insulinkonzentrationen von 1:1 Mischungen aus Eichlösungen und Seren.

Seren $\mu\text{U/ml}$	Verdünnung $\mu\text{U/ml}$	Gehalt der Mischung $\mu\text{U/ml}$	
		berechnet	gemessen
200	1:6	33,3	30
200	1:11	18,2	13,5
200	1:1,5	133,3	128
126	1:1,5	84	88

Tabelle 4: Wiederfindung der errechneten Insulinkonzentrationen von Serumverdünnungen mit Phosphatpuffer.

Eichlösung $\mu\text{U/ml}$	Verdünnung $\mu\text{U/ml}$	Gehalt der Mischung $\mu\text{U/ml}$ berechnet	$\mu\text{U/ml}$ gemessen
320	1:6	53,3	51
160	1:6	26,6	24,5
80	1:6	13,3	12
40	1:6	6,6	7
320	1:1,5	212	208

Tabelle 2: Wiederfindung der errechneten Insulinkonzentrationen
von Verdünnungen der Eichlösungen mit Phosphatpuffer.

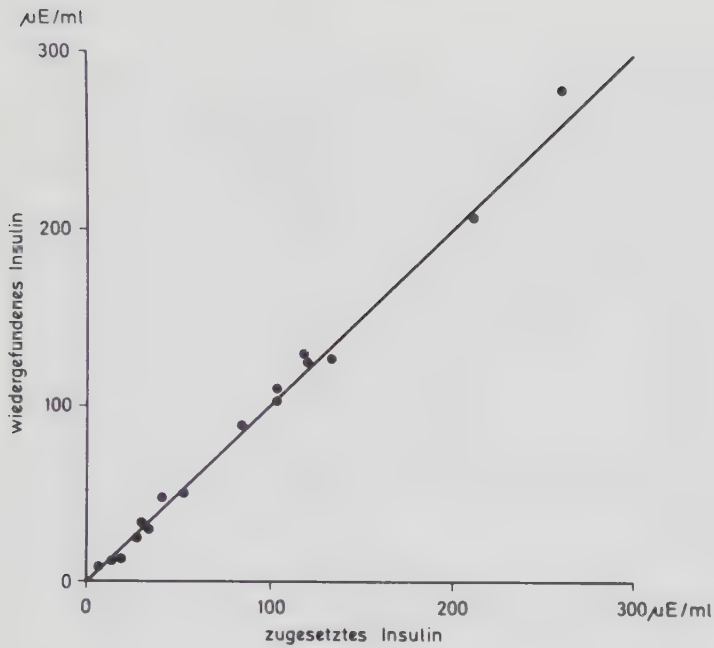


Abbildung 3 Wiederfindung von errechneten Insulinkonzentrationen aus Serum- und Eichlösungsverdünnungen. Jeder Punkt entspricht dem Mittelwert einer Dreifachbestimmung.

Bindungskapazität

Die Bindungsfähigkeit des SAIK wurde durch steigende Mengen zugesetzten Insulins ^{125}J untersucht. Dabei stieg die Radioaktivität des Niederschlages in Abhängigkeit von der zugesetzten Insulin ^{125}J -Menge kontinuierlich an (Abbildung 4).

Inkubationsdauer

Der Anstieg der gebundenen Radioaktivität wurde an Leerwertproben bei steigender Inkubationszeit untersucht. Die Inkubationsdauer und der Anteil des an SAIK gebundenen Insulins ^{125}J sind in Tabelle 6 aufgeführt. In Abbildung 5 ist die gebundene Radioaktivität in Abhängigkeit von der Inkubationsdauer dargestellt.

Inkubations- dauer (Std.)	1	3	8	20	30	45	55	70	100
Gebundenes Insulin ^{125}J in % von C_0	12	14,6	22	27	30	34	34	35	39

Tabelle 6: Antikörpergebundenes Insulin ^{125}J bei zunehmender Inkubationsdauer.

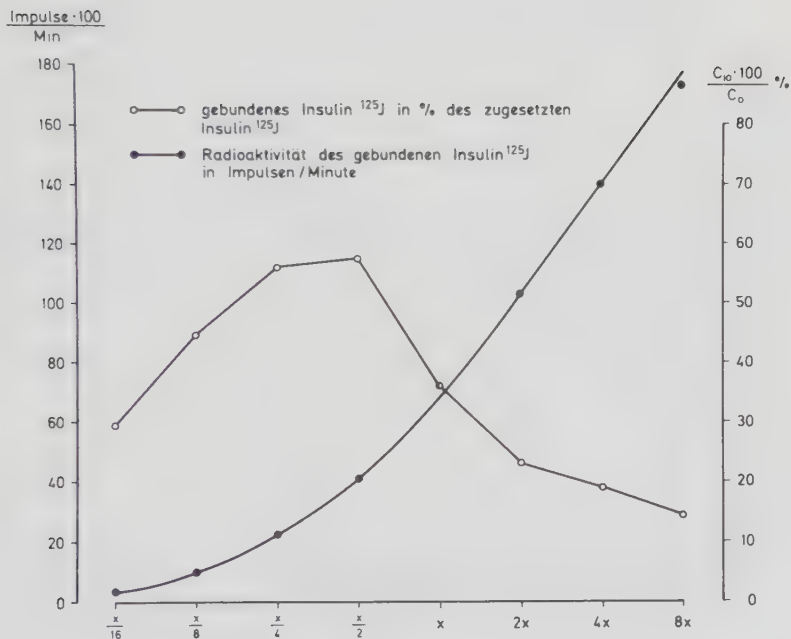


Abbildung 4 Bindung von Insulin ^{125}J an SAIK bei steigender Dosis des zugesetzten Insulin ^{125}J .
 x = normalerweise im Testansatz verwendete Dosis Insulin ^{125}J .

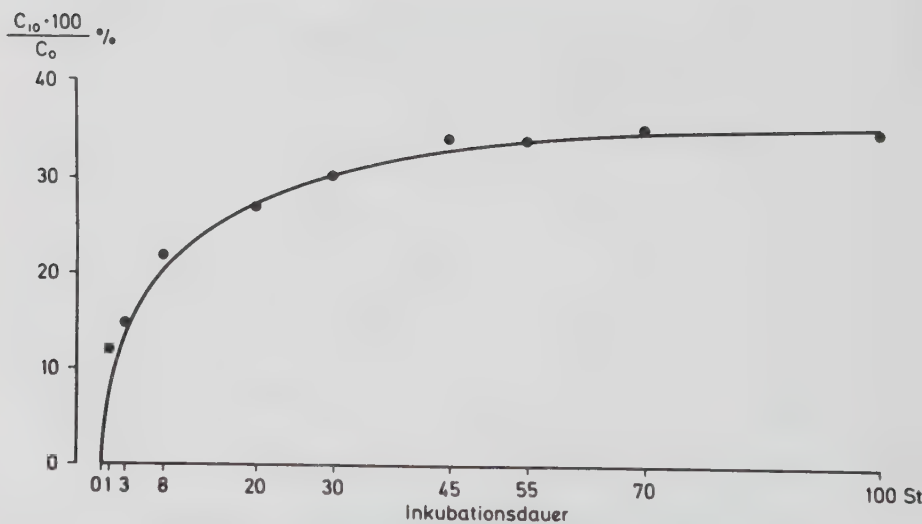


Abbildung 5 Antikörpergebundenes Insulin ^{125}J bei zunehmender Inkubationsdauer, aufgetragen in % des zugesetzten Insulin ^{125}J .

Weiterhin wurde untersucht, wie sich die SAIK-gebundene Aktivität eines Leerwertes (A) und die einer Probe mit 100 μ l Eichlösung von 40 μ U/ml (B) mit zunehmender Inkubationsdauer verändert. Der Vergleich der Werte von A und B ergab, daß sich der Quotient A/B mit zunehmender Inkubationszeit verkleinert und erst ab 5 Std. Inkubationsdauer konstant bleibt. Die Inkubationszeiten und die Werte für SAIK-gebundenes Insulin 125 J von A und B, sowie die jeweiligen Verhältnisse von A/B sind in Tabelle 7 wiedergegeben.

Inkubations- zeit (Std.)	A	B	
	$\frac{C_{i0} \cdot 100}{C_0} \%$	$\frac{C_i \cdot 100}{C_0} \%$	$\frac{B \cdot 100}{A} \%$
1	6,0	5,5	93
2	10,2	7,6	74,5
3	11,6	8,3	71,5
5	14,5	9,6	66
10	16,3	10,6	65
18	18,3	11,9	65

Tabelle 7: Einfluß der Inkubationsdauer auf die Bindung von markiertem (A) und nicht markiertem Insulin (B) an den Antikörper.

i = 40 μ U/ml.

Diskussion

Zur Bestimmung von Insulin im Serum gibt es verschiedene radioimmunologische Methoden. Sie beruhen auf der Bindung von radioaktiv markiertem Insulin an einen Insulin-Antikörper und der kompetitiven Hemmung dieser Reaktion durch unmarkiertes Insulin einer zu untersuchenden Probe. Eine der Schwierigkeiten besteht in der Trennung des antikörpergebundenen Insulins von dem freien Insulin. Bei dem hier angewandten Verfahren ist der Antikörper mit Sephadexpartikel gekoppelt. Nach der Reaktion des Antikörpers mit dem Insulin erfolgt die Trennung des gebundenen vom freien Insulin durch Sedimentieren der Sephadexpartikel in der Zentrifuge. Das im Überstand befindliche freie Insulin wird durch Absaugen entfernt. Die Radioaktivität des Sediments wird gemessen und daraus die Insulinkonzentration der Probe errechnet.

Die Bestimmung der Präzision mit Hilfe des Genauigkeitsindex setzt eine lineare Abhängigkeit der Meßwerte von der jeweils zugesetzten Insulinmenge voraus.

Da in der hier angewandten Methode die Standardkurve nicht genau linearisierbar ist, wurde die Präzision der Insulinbestimmung in Form des Variationskoeffizienten $V\%$ ausgedrückt, der den Prozentwert der Standardabweichung zum Mittelwert einer Mehrfachbestimmung angibt.

Für die Messung der Eichlösungen ergab sich ein mittlerer Variationskoeffizient von 2,4 %.

Zur Beurteilung, wie weit der Unterschied der Mittelwerte zweier benachbarter Eichlösungskonzentrationen gesichert ist, wurden jeweils die Abweichung t und die zugehörigen p -Werte ermittelt. Es ergaben sich für alle Konzentrationen signifikante Unterschiede.

Um die Reproduzierbarkeit der gemessenen Insulinkonzentrationen von Seren zu sichern, wurden diese wiederholt in verschiedenen Testansätzen gemessen. Es ergab sich eine gute Übereinstimmung der jeweils ermittelten Werte.

Voraussetzung für die Richtigkeit der Testergebnisse ist die Übereinstimmung der angegebenen Insulinkonzentrationen der Eichlösungen mit entsprechenden Verdünnungen eines internationalen Standard-Insulins.

Zur Prüfung der Eichlösungskonzentrationen des im Test verwandten Schweineinsulins wurde die Standardkurve mit der Kurve einer Verdünnungsreihe von Humaninsulin bekannter Konzentration verglichen. Es ergab sich eine gute Übereinstimmung.

Um die W i e d e r f i n d u n g von zugesetztem Insulin zu prüfen, wurden Seren bekannter Insulinkonzentration und die zur Herstellung der Standardkurve verwandten Eichlösungen verdünnt.

Weiterhin wurden die Eichlösungen mit Seren bekannter Insulinkonzentration gemischt. In allen Fällen ergab sich eine gute Übereinstimmung der errechneten Insulinkonzentration mit den gemessenen Werten.

Von den meisten Untersuchern werden S t a n d a r d k u r v e n in der ursprünglichen von YALOW und BERTON (17) beschriebenen Weise aufgestellt. In diesen Kurven wird das Verhältnis von gebundenem zu freiem Insulin ^{125}J bzw. Insulin ^{131}J (B/F) gegen die zugesetzte Insulinmenge aufgetragen. Im vorliegenden Verfahren wurde anstelle von B/F der Quotient $\frac{C_i \cdot 100}{C_{io}}$

gegen die bekannte Insulinkonzentration der Eichlösungen aufgetragen.

Die Kurve hat den Verlauf einer Exponentialfunktion.

Bei der Darstellung auf semilogarithmischem Papier ergibt sich eine leicht S-förmig gebogene Kurve (Abbildung 6).

Eine gute Linearisierung konnte durch eine Logit-Transformation erreicht werden (Abbildung 7). Die abhängige Variable wird dabei nach folgender Gleichung umgeformt:

$$\text{logit}_p = \ln \frac{p}{100 - p} ; \quad p = \frac{C_i}{C_{io}}$$

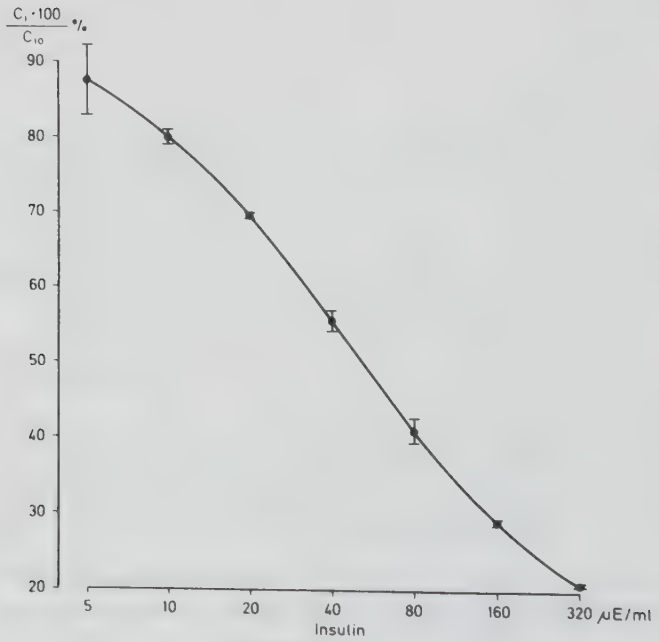


Abbildung 6 Standardkurve halblogarithmisch aufgetragen.
Mittelwerte $\pm$ Standardabweichung der Dreifach-
bestimmungen.

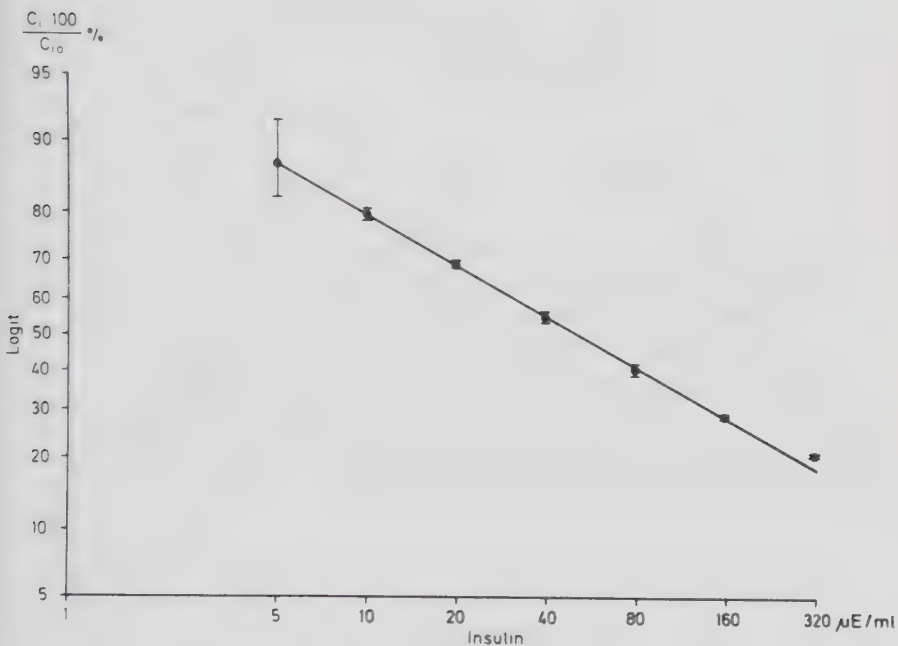


Abbildung 7 Standardkurve linearisiert durch eine Logit-Log-Transformation. Die abhängige Variable wird nach der Gleichung $l = \ln \frac{p}{100-p}$ verändert. Dabei ist $l = \text{logit}$, $p = \frac{C_{io}}{C_i}$.

Die Konzentration des unmarkierten Insulins wird logarithmisch aufgetragen.

Da bei anderen Methoden zur Insulinbestimmung der Quotient B/F gegen die Insulinkonzentrationen der Eichlösungen aufgetragen wird, errechneten wir zu Vergleichszwecken für die einzelnen Eichlösungskonzentrationen den Anteil des nicht gebundenen Insulins und den Quotienten B/F . Dabei ist $B = C_{i0}$ für den Leerwert und $B = C_i$ für steigende Insulinkonzentrationen. $F = C_0 - C_{i0}$ bzw. $= C_0 - C_i$. Die Auftragung der Quotienten B/F gegen die Eichlösungskonzentrationen ergibt die in Abbildung 8 dargestellte Kurve.

Nach der von HALES und RANDLE (3) aufgestellten Gleichung

$$\frac{C_{i0}}{C_i} = i \frac{1}{I} + 1 \text{ besteht eine lineare Beziehung von } \frac{C_{i0}}{C_i} \text{ zu } i,$$

wobei bei $i=0$ dieser Quotient gleich 1 wird. Bei einem Quotienten von 0 wird $i = -I$. I bezeichnet die Konzentration des gesamten zugesetzten Insulin ¹²⁵J. Bei allen Testverfahren, deren Standardkurven sich durch diese Formel linearisieren lassen, genügt ein einziger Referenzwert, um die Steigung der Geraden zu bestimmen. Bei dem untersuchten Testverfahren gelang die Linearisierung nach der Formel von HALES und RANDLE nicht (Abbildung 9).

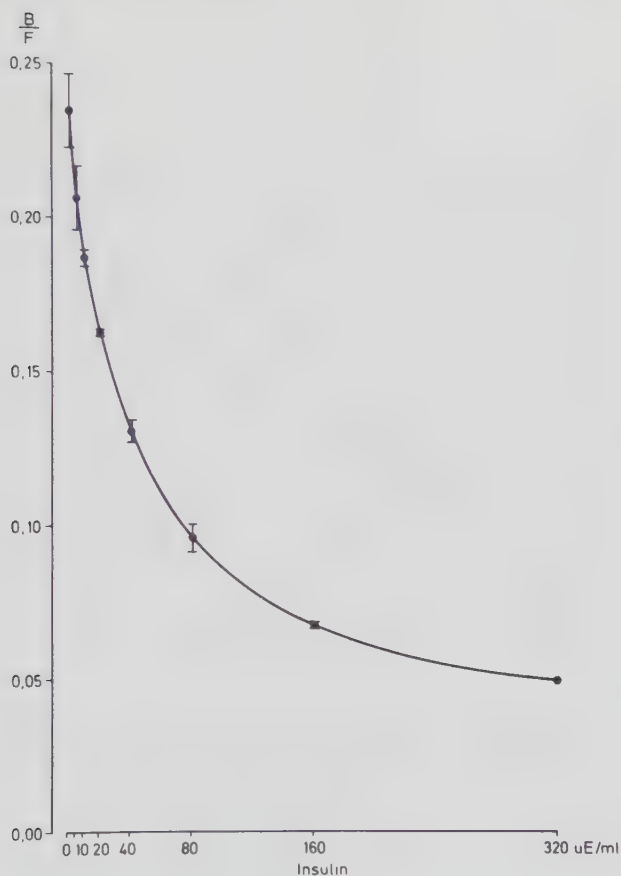


Abbildung 8 Relation von antikörpergebundenem (B) - zu freiem Insulin ^{125}J (F) als Funktion der Konzentration von zugesetztem unmarkiertem Schweine-Insulin.

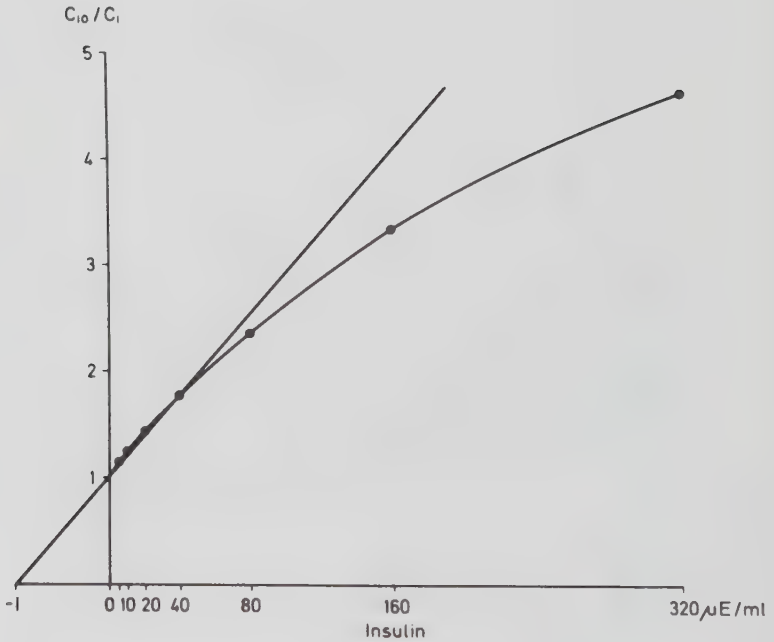


Abbildung 9 Einfluß steigender Konzentrationen unmarkierten Insulins auf den Quotienten C_{10}/C_1 , errechnet nach der von HALEG und RANDLE angegebenen Gleichung: $\frac{C_{10}}{C_1} = i \frac{1}{I} + 1$.

I = Konzentration des zugesetzten Insulin ¹²⁵J.
Die Gerade durch -1 und 1 entspricht dem Idealverlauf.

Die Bindungskapazität des Antikörpers bestimmt das Verhältnis von gebundenem zu freiem Insulin. Sie ist eine Funktion der Konzentration des insulinbindenden Antikörpers und der zugesetzten Insulinmenge sowie der kinetischen und thermodynamischen Reaktionskonstanten zwischen Insulin und Antikörper. Kriterium für die Wahl der Antikörperkonzentration im Test ist ein ausreichender Abfall des B/F-Quotienten bei geringer Änderung der Insulinkonzentration. YALOW und BERSON (17) empfehlen, die Antikörperkonzentration so zu halten, daß der B/F-Quotient des Leerwertes im Bereich von 2 bis 4 liegt. Im hier beschriebenen Test liegt der B/F-Quotient nur bei ca. 0,2 bis 0,4, die gebundene Aktivität entspricht etwa 15 - 30 % des gesamt zugesetzten Insulin ^{125}J .

Mit steigenden Insulinkonzentrationen fällt im Test die gebundene Radioaktivität bis auf 20 % von C_{10} . Unter diesen Voraussetzungen können bis zu 320 μU Insulin pro ml im unverdünnten Serum gemessen werden.

Zur Inkubationsdauer: Bei den meisten Verfahren zur Insulinbestimmung wird eine endgültige Einstellung des Gleichgewichtes zwischen gebundenem und freiem Insulin nicht abgewartet, sondern die Messung zu einem früheren Zeitpunkt durchgeführt. Die Geschwindigkeit der Gleichgewichtseinstellung hängt von den Versuchsbedingungen und den oben genannten Parametern ab. So wird z. B. in der Doppel-Antikörper-Methode von MORGAN und LAZAROW (9) das erste Reaktionsgleichgewicht erst nach 5 Tagen erreicht. Der früheste Zeitpunkt, zu dem eine Reaktion unterbrochen werden darf, muß für jede Methode ermittelt werden. Die Untersuchung zur Feststellung einer günstigen Inkubationszeit ergab, daß eine Inkubationsdauer von 5 Std. erforderlich ist. Eine längere Inkubationszeit ergibt keine wesentlichen Vorteile, obwohl ein endgültiges Reaktionsgleichgewicht erst nach 44 Std. erreicht ist.

Fehlerquellen : In den Methoden, die den Quotienten B/F als Maß für die Insulinkonzentration verwenden, spielen Störungen durch Bindung von markiertem Insulin an Plasmaproteine eine große Rolle (8,17). Die Methoden enthalten verschiedene Vorschläge, um diese Bindung so klein wie möglich zu halten, z. B. Verdünnung des Serums (8) und Inkubation bei 4°C (18). In der vorliegenden Methode werden alle Plasmaproteine mit etwa gebundenem Insulin ^{125}J ausgewaschen und der freie Anteil des Insulins ^{125}J bei der Berechnung nicht berücksichtigt. Eine Bindung des markierten Insulins an Plasmaproteine würde nur dann ins Gewicht fallen, wenn eine erhebliche Abnahme des freien Anteils eine Verschiebung des Gleichgewichtes B/F nach sich ziehen würde.

Um zu untersuchen, ob eine unspezifische Bindung von Insulin ^{125}J an Plasmaproteine von Bedeutung ist, wurde einem Ansatz statt Serum Phosphatpuffer zugesetzt, einem weiteren das Serum eines Patienten mit schwerer calzifizierender Pankreatitis und Diabetes mellitus, in dem sich kein Insulin nachweisen ließ. Der Anteil des gebundenen Insulin ^{125}J war in beiden Fällen gleich. Dieses Ergebnis spricht dafür, daß eine Störung durch unspezifische Bindung von Insulin ^{125}J an Plasmaproteine in diesem Test keine Rolle spielt.

Bei der Markierung von Insulin mit radioaktiven Isotopen und während der Inkubation entstehen radioaktive Insulinbruchstücke, die nicht mit dem SAIK reagieren können. Bei den Methoden, die B/F bestimmen, vergrößern diese Bruchstücke je nach Trennverfahren die Radioaktivität von B oder F . Besonders bei der Messung sehr kleiner Insulinmengen können dadurch Fehler verursacht werden, die das Mehrfache des eigentlichen Insulingehaltes ausmachen können (8). Daher ist bei diesen Methoden die Reinigung des markierten Insulins durch Säulenchromatographie (8, 17) notwendig.

Ein Vorteil der vorliegenden Methode ist es, daß nur der SAIK-gebundene Anteil bestimmt wird, während die radioaktiven Bruchstücke beim Waschen entfernt werden, so daß sie den Meßwert nicht verfälschen. Aus diesem Grund ist eine säulenchromatographische Reinigung des Insulin ^{125}J nicht notwendig.

Zusammenfassung

Es werden eigene Erfahrungen mit einem Radio-Immunoassay für Insulin nach einem von WIDE und PORATH angegebenen Prinzip mitgeteilt:

In dem Test wird ein an Sephadex gebundener Insulin-Antikörper eingesetzt. Während der Inkubation mit ^{125}J -markiertem und nicht markiertem Insulin erfolgt die Bindung der beiden Insuline an die polymergebundenen Antikörper. In dem entstehenden Gleichgewicht hängt die Radioaktivität der Sephadex-Anti-Insulin-Komplexe vom Verhältnis zwischen markiertem und nicht markiertem Insulin ab. Die beladenen polymeren Partikel werden durch Zentrifugieren sedimentiert. Nach mehrmaligem Waschen wird ihre Radioaktivität in einem Szintillationszähler gemessen. Die Insulinkonzentration der unbekannten Probe kann an Hand einer Standardkurve ermittelt werden.

Die Präzision der Methode wurde in Form des Variationskoeffizienten angegeben, der sich aus den Mehrfachbestimmungen verschiedener Eichlösungen mit 2,4 % ergab.

Die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse wurde durch Vielfachbestimmung der Serumproben einer iv-Glukosebelastung in verschiedenen Testansätzen ermittelt. Die mittlere relative Standardabweichung der einzelnen Serien lag bei 9,8 %.

Die Richtigkeit der Ergebnisse wurde mit Hilfe eines Humaninsulins geprüft, dessen biologische Aktivität durch Vergleich mit dem "4th International Standard of Insulin" festgestellt worden war.

Die Wiederfindung ergab Werte von 80 bis 110 % für zugesetztes Insulin.

Eine Linearisierung der Standardkurve wurde durch eine Logit-Log-Transformation erreicht.

Der Quotient gebundenes zu freiem Insulin (B/F) liegt in diesem Test bei 0,2 - 0,4, die antikörpergebundene Aktivität beträgt 15 bis maximal 40 % der gesamten zugesetzten Aktivität. Unter diesen Voraussetzungen können bis zu 320 μU Insulin/ml mit ausreichender Genauigkeit gemessen werden.

Die für eine ausreichende Bindung erforderliche Inkubationszeit wurde ermittelt.

Die anderen Insulinbestimmungsmethoden anhaftenden Fehlerquellen wie die Bindung des Insulin an Plasmaproteine und die Verunreinigung mit markierten Insulinbruchstücken beeinflussen den vorliegenden Test nicht.

Literaturverzeichnis

- 1) Genuth, S., L.A. Frohman,
H.E. Lebovitz: A Radioimmunological Assay Method
for Insulin Using Insulin-¹²⁵I
and Gel Filtration.
J. Clin. Endocr. Vol. 2: 1043 1965
- 2) Grodsky, G.M.,
P.H. Forsham: An Immunochemical Assay of Total
Extractable Insulin in Man.
J. Clin. Invest. Vol. 39: 1070 1960
- 3) Hales, C.N., P.J. Randle: Immunoassay of Insulin with Insulin-
Antibody Precipitate
Biochem. J. Vol. 88: 137 1963
- 4) Heding, L.G.: Determination of Free and Antibody-
Bound Insulin in Insulin Treated
Diabetic Patients
Horm. Metab. Res. 1: 145 1969
- 5) Herbert, V., K.-S. Lau,
C.V. Gottlieb, S.J. Bleicher: Coated Charcoal Immunoassay of
Insulin
J. Clin. Endocr. 2: 137 1965
- 6) Hunter, W.M., F.C. Greenwood: Preparation of Iodine-131 Labelled
Human Growth Hormone of High Spe-
cific Activity
Nature Vol. 194: 495 1962
- 7) Mende, R.C., H.M. Klitgaard: A Simplified Method for Immunoassay
of Human Serum Insulin
J. Nucl. Med. 3: 407 1962
- 8) Melani, F., H. Ditschuneit,
K.M. Bartelt, H. Friedrich,
E.F. Pfeiffer: Über die radioimmunologische Be-
stimmung von Insulin im Blut
Klinische Wochenschrift Jg. 43:
1001 1965
- 9) Morgan, C.R., A. Lazarow: Immunoassay of Insulin: Two Anti-
body System
Diabetes 12: 115 1963

- 10) Odell, W.D., J.F. Wilber,
W.E. Paul:
Radioimmunoassay of Thyreotropin
in Human Serum
J. Clin. Endokr. 2: 1179 1965
- 11) Rodbard, D., W. Bridson,
P.L. Rayford:
Rapid Calculation of Radioimmuno-
assay Results
J. Lab. Clin. Med. 74: 770 1969
- 12) Rosselin, G., R. Assan,
R.S. Yalow, S.A. Berson:
Separation of Antibody-Bound and
Unbound Peptide Hormones Labelled
with Iodine-131 by Talcum Powder
and Precipitated Silica
Nature, 212: 35 1966
- 13) Skon, J.H., D.W. Talmage:
Nonprecipitating Insulin Antibodies
J. Clin. Invest. 37: 783 1958
- 14) Wide, L., J. Porath:
Radioimmunoassay of Proteins with
the Use of Sephadex-coupled Anti-
bodies
Biochem. Biophys. Acta, 130: 257
1966
- 15) Wombacher, H., E. Nieschlag:
Eine neue Trennmethode für Radio-
immunoassays von Proteohormonen:
Enzymatische Proteolyse des freien
Hormons durch Pronase
Z. klin. Chem. u. klin. Biochem.
9, Jg. 136 1971
- 16) Wright, P.H., D.R. Makulu,
W.J. Malaisse, H.M. Roberts,
P.L. Yu:
. Method for the Immunoassay of
Insulin
Diabetes, 17: 537 1968
- 17) Yalow, R.S., S.A. Berson:
Immunoassay of Endogenous Plasma
Insulin in Man
J. Clin. Invest. 39: 1157 1960
- 18) Yalow, R.S., S.A. Berson:
Immunoassay of Plasmainsulin
Meth. Biochem. Analysis 12: 695 1964
- 19) Zaharko, D.S., L.V. Beck:
Studies of Simplified Plasma Insulin
Immunoassay Using Cellulose Powder
Diabetes, 17: 444 1968

Insulinbestimmungen bei Patienten mit chronisch calcifizierender Pankreatitis unter Belastung mit Glukagon und Pankreozymin

I n h a l t

	Seite
I. <u>Einleitung</u>	1
II. <u>Material und Methoden</u>	2
Untersuchungsgut	2
Untersuchungsgang	2
III. <u>Ergebnisse</u>	4
Seruminsulinspiegel bei Patienten und Kontrollpersonen	4
Blutzuckerwerte bei Patienten und Kontrollpersonen	7
IV. <u>Diskussion</u>	11
V. <u>Zusammenfassung</u>	12
VI. <u>Literatur</u>	13

Insulinbestimmungen bei Patienten mit chronisch calzifizierender Pankreatitis unter Belastung mit Glucagon und Pankreozymin

Einleitung

Mc INTYRE (17) machte ebenso wie SCOW et. al. (30) und DUPRÉ (9) die Beobachtung, daß die Steigerung der Insulinsekretion bei Glukosebelastung nicht nur von der zugeführten Glukosenenge abhängig ist, sondern auch von dem Weg, auf welchem sie dem Organismus zugeführt wird. Es wurde daher vermutet, daß den intestinalen Hormonen eine Rolle bei der Freisetzung des Insulins nach oraler Glukoseverabreichung zukommt.

ELRICK und Mitarbeiter (12) gaben oral und intravenös die gleiche Glukosemenge. Durch ihre Versuchsanordnung erzielten sie etwa gleich hohe Blutzuckerspiegel, fanden jedoch bei der oralen Glukosebelastung höhere Seruminsulinspiegel als nach intravenöser Glukosegabe. Nach oraler Glukosegabe wurden nicht nur absolut höhere Seruminsulinwerte erreicht, der Insulinspiegel blieb auch länger erhöht.

Die Annahme, daß die intestinalen Hormone eine Insulinfreisetzung bewirken, konnte durch zahlreiche in vivo- und in vitro-Experimente bestätigt werden. So konnte gezeigt werden, daß sowohl Gastrin (10, 21, 24, 29, 33) als auch Sekretin (2, 3, 7, 11, 18, 27, 28, 33, 34) und Pankreozymin (4, 10, 13, 16, 25, 33) sowie Glucagon (5, 23, 31) bei parenteraler Verabreichung zu einer Insulinsekretion führen.

Bei Stimulationsversuchen an isolierten B-Zellen (16) und Ratten mit künstlicher exokriner Pankreasinsuffizienz (13) wurde jedoch festgestellt, daß nur Pankreozymin von allen intestinalen Hormonen direkt auf die B-Zellen stimulierend wirkt. Die Wirkung der übrigen intestinalen Hormone auf die B-Zellen ist offenbar an ein funktionsfähiges exokrines Pankreas gebunden.

In der vorliegenden Arbeit wurde der Einfluß von Glucagon und Pankreozymin auf die Insulinsekretion und den Blutzuckerspiegel bei Patienten mit sekundärem Diabetes mellitus bei chronischer calzifizierender Pankreatitis untersucht.

Material und Methoden

Als Untersuchungsgut dienten 10 Patienten im Alter von 29 bis 60 Jahren mit klinisch und röntgenologisch gesicherter chronischer calzifizierender Pankreatitis bei langdauerndem Alkoholabusus.

Bei allen Patienten war es im Verlauf der Erkrankung zur Manifestation eines Diabetes mellitus gekommen.

Die exkretorische Pankreasinsuffizienz war bei allen Probanden durch den Sekretin-Pankreozymin-Test gesichert. Aufgrund dieser Untersuchung wurden die Patienten in 2 Gruppen unterteilt:

- 1.) Bei vier Patienten mit "mäßiger exkretorischer Pankreasinsuffizienz" waren im Sekretin-Pankreozymin-Test einzelne der gemessenen Parameter (Enzyme, Bicarbonat, Volumen) stark erniedrigt, andere nur gering.
- 2.) Bei 6 Patienten mit "ausgeprägter exkretorischer Pankreasinsuffizienz" waren alle Parameter stark erniedrigt.

Untersuchungsgang

Die Untersuchungen wurden morgens zwischen 8 und 10 Uhr nach einer Nahrungskarenz von 14 Stunden durchgeführt. Nach einer vorangegangenen Blutentnahme zur Bestimmung des Blutzuckers und Seruminsulins wurde den Probanden 1 mg Glucagon/75 kg Körpergewicht (Glucagon Lilly) intravenös injiziert. Weitere Blutabnahmen erfolgten 1, 3, 5, 10, 15 und 20 Minuten nach Beendigung der Glucagoninjektion. Unmittelbar nach der letzten Blutabnahme wurde 1 E Pankreozymin/kg Körpergewicht in 10 ml 0,9 %iger Na Cl-Lösung intravenös injiziert. 1, 3, 5, 10, 15 und 20 Minuten nach der Injektion wurde erneut venöses Blut zur Bestimmung des Seruminsulins und des Blutzuckers entnommen.

Als Kontrollen dienten fünf stoffwechselgesunde Probanden im Alter von 23 - 33 Jahren, bei denen weder klinisch noch röntgenologisch ein Anhalt für eine Pankreaserkrankung bestand. Die Untersuchung wurde bei diesen Patienten in der gleichen Weise wie oben angegeben durchgeführt.

Der Blutzucker wurde mit der Orthotoluidin-Methode im "Auto-Analyser" und das Seruminsulin radioimmunologisch nach WIDE und PORATH (35) gemessen.

Sowohl das verwandte Glucagon als auch das Pankreozymin wurden auf Verunreinigung mit Insulin untersucht.

Ergebnisse

Der Nüchtern-Seruminsulinspiegel betrug bei den Patienten mit chronischer calzifizierender Pankreatitis $11,0 \pm 4,2 \mu \text{ E/ml}$. Nach der Injektion von Glucagon kam es im Mittel zu einem geringen, nicht signifikanten und nur kurz dauernden Anstieg des Seruminsulins. Schon wenige Minuten nach der Glucagoninjektion wurden die Ausgangswerte wieder erreicht. Auch nach der Injektion von Pankreozymin trat nur ein geringer, nicht signifikanter Anstieg des Seruminsulins ein.

Bei den stoffwechselgesunden Kontrollpersonen betrug der Nüchtern-Seruminsulinspiegel $10,8 \pm 2,2 \mu \text{ E/ml}$. Nach Glucagoninjektion kam es zu einem starken Anstieg des Seruminsulins. Die höchsten Werte wurden 3 Minuten nach der Injektion gemessen. Nach 20 Minuten war der Insulinspiegel noch auf etwa das Vierfache der Ausgangswerte erhöht.

Die Injektion von Pankreozymin führte erneut zu einem starken Anstieg des Seruminsulins.

Die Werte des Seruminsulins lagen bei den Kontrollpersonen während der gesamten Glucagon- und Pankreozyminbelastung signifikant über dem Nüchtern-Insulinspiegel, der bei Patienten und Kontrollpersonen fast identisch war. Die gemessenen Werte sind in Tabelle 1 wiedergegeben und in Abbildung 1 graphisch dargestellt.

Der Anstieg der Seruminsulinwerte bei den Kontrollpersonen nach Glucagon- und Pankreozymininjektion ist signifikant im Vergleich zu den entsprechenden Werten der Patienten ($p < 0,01$).

Glucagonbelastung IMI $\mu\text{E/ml} \pm S_M$				Pankreozyminbelastung IMI $\mu\text{E/ml} \pm S_M$			
Zeit Min.	Kontroll- personen n=5	Patienten n=10		Zeit Min.	Kontroll- Personen n=5	Patienten n=10	
0	10,8 $\pm$ 2,2	11,0 $\pm$ 4,2	$p > 0,05$				
1	67,6 $\pm$ 16,8	19,8 $\pm$ 4,1	$p < 0,05$	21	116,2 $\pm$ 24,1	16,1 $\pm$ 3,9	$p < 0,01$
3	84,6 $\pm$ 13,8	16,5 $\pm$ 3,5	$p < 0,001$	23	128,8 $\pm$ 27,6	19,7 $\pm$ 3,9	$p < 0,01$
5	68,4 $\pm$ 7,5	14,8 $\pm$ 3,3	$p < 0,001$	25	111,4 $\pm$ 17,1	16,6 $\pm$ 2,2	$p < 0,001$
10	50,6 $\pm$ 7,0	14,0 $\pm$ 3,4	$p < 0,001$	30	69,4 $\pm$ 11,3	14,5 $\pm$ 2,3	$p < 0,001$
15	45,6 $\pm$ 7,8	12,6 $\pm$ 3,4	$p < 0,01$	35	47,0 $\pm$ 8,7	13,7 $\pm$ 2,2	$p < 0,01$
20	41,8 $\pm$ 5,3	12,1 $\pm$ 6,8	$p < 0,05$	40	41,1 $\pm$ 8,1	12,6 $\pm$ 2,2	$p < 0,01$

Tabelle 1: Seruminsulinkonzentrationen bei Kontrollpersonen und Patienten mit chronischer calzifizierender Pankreatitis nach Injektion von Glucagon (1 mg/75 kg Körpergewicht) und Pankreozymin (1 E/kg Körpergewicht).
Mittelwerte $\pm$ Standardabweichung der Mittelwerte (S_M).

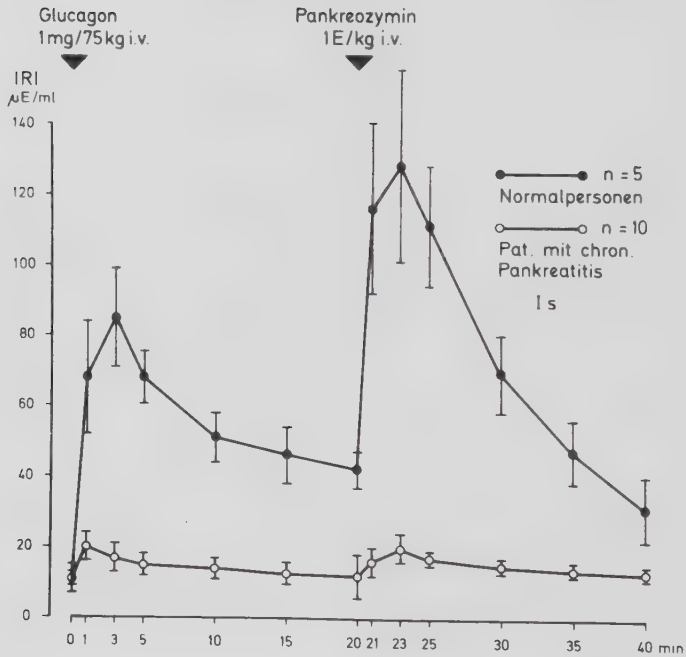


Abbildung 1 Insulinsekretion bei Normalpersonen und Patienten mit chronischer Pankreatitis und Diabetes mellitus gemessen nach Stimulation mit Glucagon und Pankreozymin.

Vergleicht man die gemessenen Seruminsulinspiegel der Patienten mit mäßiger und starker exkretorischer Pankreasinsuffizienz untereinander, so ist ersichtlich, daß die Seruminsulinspiegel bei den Patienten der ersten Gruppe höher sind als bei den Patienten der zweiten Gruppe. Die Unterschiede sind jedoch nicht signifikant.

Die Nüchternblutzuckerwerte der Kontrollpersonen betrugen $84,2 \pm 2,6 \text{ mg \%}$ und die der Patienten $123,7 \pm 16,3 \text{ mg \%}$.

Nach der Injektion von Glucagon kam es bei Patienten und Kontrollpersonen zu einem Anstieg der Blutzuckerkonzentrationen. Nach Pankreozymin fielen nur die Blutzuckerwerte der Kontrollpersonen bis fast auf den Nüchternwert ab. (Tabelle 2, Abbildung 2.) Die Blutzuckerspiegel der Patienten lagen bei allen Messungen signifikant über denen der Kontrollpersonen ($p < 0,05$).

Die Verunreinigung von Glucagon und Pankreozymin mit Insulin war sehr gering. Sie betrug für Glucagon ca. 2 mE/mg und für Pankreozymin ca. $0,5 \text{ mE/75 HE}$.

Glucagonbelastung Blutzucker mg % $\pm S_M$				Pankreozyminbelastung Blutzucker mg % $\pm S_M$					
Zeit Min.	Kontroll- personen n=5		Patienten n=10		Zeit Min.	Kontroll- personen n=5		Patienten n=10	
0	84,2 $\pm$ 2,6	123,7 $\pm$ 16,3	p < 0,05						
1	84,4 $\pm$ 2,1	125,4 $\pm$ 17,3	p < 0,05		21	127,2 $\pm$ 7,4	183,3 $\pm$ 22,6	p < 0,05	
3	87,8 $\pm$ 3,9	137,1 $\pm$ 19,3	p < 0,05		23	123,2 $\pm$ 11,0	178,1 $\pm$ 20,6	p < 0,05	
5	98,8 $\pm$ 4,5	148,3 $\pm$ 19,8	p < 0,05		25	121,8 $\pm$ 9,6	179,5 $\pm$ 20,1	p < 0,05	
10	112,6 $\pm$ 5,8	172,5 20,5	p < 0,05		30	111,0 $\pm$ 11,6	180,0 $\pm$ 21,8	p < 0,05	
15	123,0 $\pm$ 8,1	172,7 $\pm$ 18,7	p < 0,05		35	102,8 $\pm$ 13,3	180,3 $\pm$ 22,6	p < 0,05	
20	127,4 $\pm$ 8,8	185,6 $\pm$ 20,1	p < 0,05		40	91,8 $\pm$ 11,9	170,0 $\pm$ 21,3	p < 0,01	

Tabelle 2: Blutzuckerkonzentrationen bei Kontrollpersonen und Patienten mit chronischer calcifizierender Pankreatitis nach Injektion von Glucagon (1 mg/75 kg Körpergewicht) und Pankreozymin (1 E/kg Körpergewicht).
Mittelwerte $\pm$ Standardabweichung der Mittelwerte (S_M).

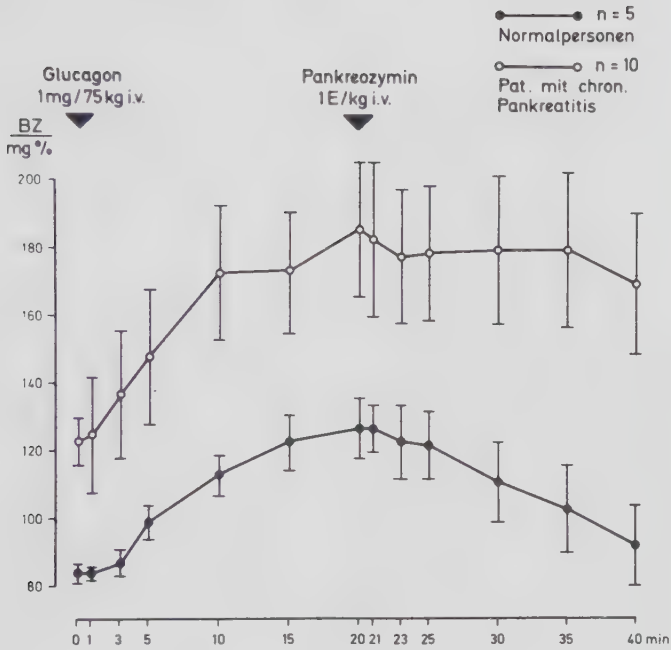


Abbildung 2 Blutzuckerspiegel bei Normalpersonen und Patienten mit chronischer Pankreatitis und Diabetes mellitus, gemessen nach Stimulation von Glucagon und Pankreozymin.

Diskussion

Die Untersuchungen zeigen, daß nach der parenteralen Applikation von Glucagon und Pankreozymin bei Patienten mit chronischer calzifizierender Pankreatitis und Diabetes mellitus nur eine geringe aber nicht signifikante Erhöhung des Seruminsulinspiegels erfolgt ($p > 0,05$). Im Mittel kam es zu einem Anstieg auf das Doppelte des Ausgangswertes. Dabei war der Anstieg des immunologisch meßbaren Insulins nach Verabreichung von Glucagon etwa gleich groß wie nach Pankreozymin. Bei den Kontrollpersonen stieg der Seruminsulinspiegel nach Glucagon auf das 8fache und nach Pankreozymin auf das 12fache des Ausgangswertes.

Nach der Injektion von Glucagon kommt es sowohl bei den Patienten als auch bei den Kontrollpersonen zu einem gleichmäßigen Anstieg des Blutzuckers. Der Abfall des Blutzuckerspiegels war bei den Patienten nach der Injektion von Pankreozymin jedoch wesentlich geringer. Dies war offenbar die Folge der mangelhaften Insulinsekretion nach Pankreozymin.

Die Untersuchungen zeigen insgesamt, daß sich bei Patienten mit chronischer calzifizierender Pankreatitis die erheblich eingeschränkte Insulinsekretion auch durch starke Stimulation wie durch Glucagon und Pankreozymin nicht wesentlich steigern läßt. Durch die Zerstörung des Pankreas war es bei den untersuchten Probanden zur Manifestation eines Diabetes mellitus gekommen.

Patienten und Kontrollpersonen zeigten gleiche Seruminsulin-Nüchternwerte. Dies deckt sich mit den Untersuchungsergebnissen anderer Autoren (1, 22, 30), die bei Patienten mit chronischer Pankreatitis und Diabetes mellitus normale bis leicht erhöhte Insulin-Nüchternwerte fanden.

Der nur geringe Anstieg des Seruminsulins nach Glucagongabe steht in Übereinstimmung mit den Ergebnissen anderer Autoren (14, 19), die bei Patienten mit chronischer Pankreatitis durch maximale Stimulierung der Insulinsekretion mit Glucose, Glucagon und Tolbutamid ebenfalls nur einen geringen Anstieg des Seruminsulins erzielen konnten.

Auch KALK et. al. (20) fanden eine geringe Insulinausschüttung nach Pankreozyminstimulation bei Patienten mit chronischer calzifizierender Pankreatitis.

Im Einzelfall hängt die Verminderung der Insulinreserve offenbar von Ausmaß der entzündlichen Destruktion des Pankreas ab. Andere Autoren (26) fanden keine Korrelation zwischen exokriner und endokriner Pankreasfunktion bei Patienten mit chronischer Pankreatitis und Diabetes mellitus.

Zusammenfassung

Bei zehn Patienten mit röntgenologisch, klinisch und laborchemisch erwiesener chronischer calzifizierender Pankreatitis, davon vier mit mäßiger exokriner Insuffizienz, und sechs mit ausgeprägter exkretorischer Insuffizienz, wurde die Wirkung von Glucagon und Pankreozymin auf die Insulinsekretion und den Blutzuckerspiegel im Vergleich zu fünf gesunden Kontrollpersonen untersucht.

Nach beiden Hormonen konnten die Patienten ihren Insulinspiegel auf das Doppelte des Nüchternwertes erhöhen, ein Maximum von 20 μ E/ml wurde jedoch nicht überschritten.

Der Unterschied der Maximalwerte zum mittleren Nüchternwert war statistisch nicht signifikant. Die Insulinausschüttung der Patienten war nach beiden Hormonen gleich, während die der Kontrollpersonen nach Pankreozymin höhere Werte erreichte als nach Glucagon.

Die Blutzuckerspiegel der Patienten lagen während des gesamten Tests signifikant über denen der Kontrollpersonen.

Die Gruppe der Patienten mit mäßiger exokriner Insuffizienz hatte gering höhere Insulinspiegel und niedrigere Blutzuckerwerte als die Gruppe mit ausgeprägter exokriner Insuffizienz.

Literaturverzeichnis

- 1) Anderson, M.F., S.H.H. Davison, Plasma Insulin in Pancreatic
A.P. Dick, C.N. Hales, J. Owens: Disease
Gut 11: 524 - 31 1970
- 2) Bottermann, P., K. Schwarz, Stimulierung der Insulin-
M.M. Forell, H. Stahlheber, sekretion durch Sekretin
I. Souvatzoglou: beim Menschen
Klinische Wochenschrift,
45. Jg., 52 1967
- 3) Boyns, D.R., R.J. Jarrett, Intestinal Hormones and Plasma
H. Keen: Insulin: an Insulinotropic
Action of Secretin
Brit. med. J., 1967, 2, 276
- 4) Buchanan, K.D., J.E. Vangg, Effect of Pancreozym in
A. Morgan, R.H. Williams: Insulin and Glucagon Levels
in Blood and Bile
Am. J. Physiol., 215: 1293 1968
- 5) Crockford, P.M., D. Porte Jr, Effect of Glucagon on Serum
F.C. Wood Jr, R.H. Williams: Insulin, Plasma Glucose and
Free Fatty Acids in Man
Metabolism, 15: 114 1966
- 6) Crockford, P.M., W.R. Hazzard, Insulin Response to Glucagon
R.H. Williams: Diabetes, 18: 216 1969
- 7) Deckert, R.: Stimulation of Insulin Secretion
by Glucagon and Secretin
Acta endocr., 57: 578 1968
- 8) Deckert, T.: Insulin Secretion after Secretin
in Patients with Diabetes
Mellitus
Diabetologia, 4: 310 1968
- 9) Dupré, J.: An Intestinal Hormone affecting
Glucose Disposal in Man
Lancet, 672 1964/2

- 10) Dupré, J., J.D. Curtis,
R.H. Unger, R.W. Waddell,
J.C. Beck:
Effects of Secretin, Pankreozymin,
or Gastrin on the Response of
the Endocrine Pancreas to
Administration of Glucose or
Arginine in Man
J. Clin. Invest., 48: 745 1969
- 11) Dupré, J., L. Rojas, J.J.White,
R.H. Unger, J.C. Beck:
Effects of Secretin on Insulin
and Glucagon in Portal and
Peripheral Blood in Man
Lancet, 2: 26 1966
- 12) Elrick, H., L. Stummeler,
C.J. Hlad jr., V. Arai:
Plasma Insulin Response to
Oral and Intravenous Glucose
Administration
J. Clin. Endocr., 24: 1076 1964
- 13) Goberna, R., R.D. Fussgänger,
S. Raptis, Mc Telib,
E.F. Pfeiffer:
Insulin Response to Secretin
and Pankreozymin in Experimen-
tally-Induced Pancreatic
Exocrine Insufficiency
Diabetologia, 7: 68 - 72 1971
- 14) Grabner W., D. Berger,
H. Scharrer, B. Sommer, G. Berg:
B-Zellenstimulation bei chroni-
scher und chronisch-rezidivieren-
der Pankreatitis
Klin. Wschr. 49: 765-767 1971
- 15) Grabner, W., J. Philipp,
A. Mayer, U. Daniel, F. Matzkies:
Nachweis inkretorischer Funktions-
störungen bei chronischer
Pankreatitis
Dtsch. med. Wschr. 99:
445-448 1974
- 16) Hinz, M., N. Katsilambros,
B. Schweitzer, S. Raptis,
E.F. Pfeiffer:
The Effect of Pankreozymin,
Secretin, Gastrin-Pentapeptide
and of Glucagon upon Insulin
Secretion of Isolated Islets of
Rat Pancreas
Diabetologia 7: 1 - 5 1971

- 17) Mc Intyre, N., C.D. Holdsworth, New Interpretation of Oral
D.S. Turner: Glucose Tolerance
Lancet, 2: 20 1964
- 18) Jarrett, R.H., N.M. Cohen: Intestinal Hormones and Plasma-
Insulin
Lancet, 2: 861 1967
- 19) Joffe, B.J., S. Banks, Insulin Reserve in Patients
W.P.U. Jackson, P. Keller, with Chronic Pancreatitis
J.G. O'Reilly, A.J. Vinik: Lancet, 890 - 892 1968
- 20) Kalk, W.J., A.J. Vinik, S.Banks, Selective Loss of Beta Cell
P. Keller, W.P.U. Jackson: Response to Glucose in
Chronic Pancreatitis
Horm. Metab. Res. 6: 95-98 1974
- 21) Kaneto, A., K. Kosaka, Stimulation of Insulin Secretion
Y. Tasaka, K. Nakao: by the C-Terminal Tetrapeptide
/mide of Gastrin
Endocrinology, 84: 1098 1969
- 22) Keller, Pl., S. Bank, Plasma-Insulin Levels in
W.P.U. Jackson, I.N. Marks, "Pancreatitis Diabetes"
I.G. O'Reilly: Lancet, 2: 1211 1965
- 23) Ketterer, H., A.M. Eisentraut, Effect upon Insulin Secretion of
R.H. Unger: Physiologic Doses of Glucagon
administered via the Portal Vein
Diabetes, 16: 283 1967
- 24) Lernmark, A., B. Hellman, Effects of Gastrin on the
H.G. Coore: Release of Insulin in vitro
J. Endocr., 43: 371 1969
- 25) Meade, R.C., H.A. Kneubuhler, Stimulation of Insulin Secretion
W.J. Schulte, J.J. Barboriak: by Pankreozymin
Diabetes, 16: 141 1967
- 26) Peters, N., A.P. Dick, C.N. Hales, Exocrine and Endocrine Pancreatic
D.H. Orrell, M. Sarner: Function in Diabetes mellitus
and Chronic Pancreatitis
Gut 7: 277 - 281 1966

- 27) Pfeiffer, E.F., M. Telib,
J. Ammon, F. Melanie,
H. Ditschuneit: Direkte Stimulierung der
Insulinsekretion in vitro durch
Sekretin.
Dtsch. Med. Wschr., 90: 1663
1965
- 28) Raptis, S., K.E. Schröder,
J.D. Faulhaber, E.F. Pfeiffer: Stimulierung der Insulin-
sekretion durch Sekretin
bei Diabetikern
Dtsch. Med. Wschr., 93:
2420 1968
- 29) Rehfeld, J.F.: Effect of Gastrin and its
C-Terminal Tetrapeptide on
Insulin Secretion in Man
Acta Endocr., 66: 169 1971
- 30) Rogers, J.B., J.M. Howard,
F.W. Pairent: Serum Insulin Levels in Patients
with Chronic Pankreatitis
The American Journal of Surgery
Vol. 119: 171-76 1970
- 31) Samols, E., G. Marri,
V. Marks: Promotion of Insulin Secretion
by Glucagon
Lancet, 2: 415 1965
- 32) Scow, R.P., J. Cornfield: Quantitative Relation between
the Oral and Intravenous
Glucose Tolerance Curves.
Am. J. Physiol., 179: 435 1954
- 33) Unger, R.H., H. Ketterer,
J. Dupré, A.M. Eisentraut: The Effects of Secretin
Pancreozymin and Gastrin on
Insulin and Glucagon Secretion
in Anesthetized Dogs.
J. Clin. Invest., 46: 630 1967
- 34) White, J.J., J. Dupré: Regulation of Insulin Secretion
by the Intestinal Hormone,
Secretin: Studies in Man via
Transumbilical Portal Vein
Catheterization.
Surgery, 64: 204 1968

35) Wide, L., J. Porath:

Radioimmunoassay of Proteins
with the Use of Sephadex-
coupled Antibodies.

Biochim. Biophys. Acta,

130: 257 1966

Frau Prof. Dr. A. Englhardt danke ich für die
freundliche Überlassung der Themen und die
jederzeit hilfsbereite und geachtete Unterstützung

Lebenslauf

Am 2. Oktober 1943 wurde ich als dritter Sohn des Kaufmanns Heinrich Bersch und dessen Ehefrau Luise, geb. Sünner, in Marburg/Lahn geboren.

Von 1950 bis 1954 besuchte ich die Grundschule (Südschule) in Marburg und anschließend bis 1964 die Martin-Luther-Schule ebenfalls in Marburg. Hier legte ich am 4. März 1964 die Reifeprüfung ab.

Im April 1964 trat ich als Offiziersanwärter in die Bundeswehr ein. Im März 1967 beendete ich als Leutnant die dreijährige Dienstzeit.

Im Sommersemester 1967 begann ich das Studium der Humanmedizin an der Albert-Ludwig-Universität in Freiburg i.Br. und wechselte nach der naturwissenschaftlichen Vorprüfung am 10. Juli 1968 zur Philipps-Universität Marburg.

Am 19. März 1970 bestand ich die ärztliche Vorprüfung und am 19. Dezember 1973 die ärztliche Prüfung.

Am 15. Januar 1974 begann ich meine Medizinalassistentenzeit in der Medizinischen Poliklinik in Marburg.

Am 7. März 1969 heiratete ich die Lehrerin Birgit Göttig.

Meine Lehrer waren die Damen und Herren Professoren und Dozenten:

In Freiburg:

Bauer, Dreizler, Fischer, Fleckenstein, Geick, Hammersen, Holzner, Keller, Kümmel, Lüttringhaus, Mohr, Puff, Rudolph, Schmidt, Staubesand, Wittekind, Zuleger.

In Marburg:

Amon, Berendes, Bommer, Brück, Buchholz, Dölle, **Englhardt**, Exner, Friederich, Ganz, Geißler, Golenhofen, Graul, Hamelmann, Hamn, Hardewig, Hensel, Hess, Heuser, Hildebrandt, Hort, Jakob, Joseph, Karlson, Keil, Koransky, Linneweh, Martini, Nesswetha, Oehmig, Petry, Pots, Reim, Rodeck, Rohen, Schleyer, Schmid, Schmitz-Moormann, Seidel, Siegert, Solcher, Straub, Uhlarik, Voss.

